

食肉より分離した乳酸球菌が生産する バクテリオシンの抗菌特性

岡部 重人^{a)}・睦 宗洙^{b)}・瀬脇 智満・片岡 啓
泉本 勝利・宮本 拓

(応用動物機能学講座)

Characteristics of Bacteriocin Produced by Enterococcus Strain from Meat

Shigeto Okabe^{a)}, Jong-Soo Mok^{b)}, Tomomitsu Sewaki,
Kei Kataoka, Masatoshi Izumimoto and Taku Miyamoto

(Department of Animal Science)

To control the growth of foodborne spoilage bacteria in fermented meat products, 732 strains of lactic acid bacteria were isolated from commercial meats, and their inhibitory activities were investigated by paper disc assay using *Staphylococcus aureus* IAM 1011 and *Listeria monocytogenes* VTU 206 as indicator strains. Four strains produced antibacterial substances and one of them showed greater activity against two indicator strains. It was identified as *Enterococcus faecium*, and it was designated as strain C210. Antibacterial activity was high between the late-logarithmic growth phase and early-stationary growth phase in broth media. Activity in the antibacterial substance was not detectable after treatments with proteolysis enzymes such as pepsin, carboxypeptidase, aminopeptidase, pronase E and proteinase K. The bacteriocin was heat-stable and showed greater antibacterial activity at low pH. The substance showed antibacterial activity against 5 species of lactic acid bacteria in addition to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, although it was not active against Gram-negative bacteria. It exhibited bacteriostatic action at pH 4.5, and bactericidal action at pH 6.5 against *Listeria monocytogenes* as an indicator strain.

Key words : *Enterococcus faecium*, meat, bacteriocin, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*

緒 言

発酵食肉製品は、地中海を中心に2000年以上前から存在しており¹⁾、非加熱肉を発酵、熟成、乾燥させて造った畜肉加工品である。日本では1993年の食品衛生法の改正²⁾に伴い、新たな食肉需要の新分野として期待されるようになった。発酵肉製品は、本来原料肉に付着した有用細菌により発酵させてきたが、1957年アメリカで販売された *Pediococcus*

*acidilactici*³⁾ を皮切りに工業用スターターによる発酵が試みられてきた。スターターカルチャーは、主に乳酸菌が用いられているが、その役割は風味を与

Received October 1, 1999

a) 現在：日本食研株式会社
(Nihon Syokken Co., Ltd.)

b) 現在：国立水産振興院，大韓民国
(National Fisheries Research & Development Institute, Korea)

えるだけでなく、保存性にも関与している。

乳酸菌スターターが生産する抗菌物質には、乳酸をはじめとする有機酸、揮発性脂肪酸、過酸化水素、安息香酸などが知られているが、バクテリオシンと呼ばれるタンパク質性の抗菌物質を生産することも明らかにされている。乳酸菌の生産するバクテリオシンについては Diplococcin⁴⁾, Nisin⁵⁾, Helveticin J⁶⁾, Sakacin A⁷⁾などの多数の抗菌性ペプチドが単離されている。*Enterococcus faecium* についても、Enterocin 100⁸⁾, Enterocin A⁹⁾, Enterocin P¹⁰⁾等の抗菌性ペプチドが報告されている。

本研究では、発酵食肉製品中の汚染細菌の増殖抑制を目的として、それらに対して抗菌活性を示す乳酸菌の検索を行った。

材料と方法

供試菌株

被検菌には *Staphylococcus aureus* IAM1011と *Listeria monocytogenes* VTU206を用いた。*Staphylococcus aureus* は酵母エキス0.25%, ペプトン0.5%, グルコース1%を含む培地, *Listeria monocytogenes* は Tryptic soy broth (Difco) を用い、16~18時間、37℃で3回継代し使用した。

抗菌性乳酸菌のスクリーニング

市販の食肉(牛肉, 豚肉, 鶏肉および鯨肉)を用い、20℃および40℃での増菌培養後に乳酸菌732株を単離した。それらを MRS 培地 (Oxoid) で3回継代培養し賦活化した後、24時間培養した培養液を pH 4.5に調整して、4℃で15,000r.p.m., 20分間の遠心分離を行い、菌体除去液として用いた。スクリーニングは菌体除去液を用いてペーパーディスク法で行った。

抗菌活性の測定

いずれの実験も抗菌活性の測定は、ペーパーディスク法で行った。まず、内径8.6cmのフラットシャーレに1%量の被検菌を添加した寒天培地5mlを加えて平板とし、30~60分間放置する。寒天培地は、*Staphylococcus aureus* IAM1011では標準寒天培地(ニッスイ), *Listeria monocytogenes* VTU206では Tryptic soy broth (Difco) に Bacto agar (Difco) を1.5%加えたものを使用した。そして、直径13.0mmの滅菌ペーパーディスク(Whatman)に菌体除去液0.1mlを滴下して、無菌的に平板上に置き、被検菌の

至適温度と至適時間で培養して阻止円の直径を計測した。

菌株の同定

スクリーニングを行った結果、最も抗菌活性の強かった菌株の同定を行った。菌株の同定は常法に従い、グラム染色、菌の形態観察、カタラーゼテスト、グルコースからのガス生産性、生育温度範囲、馬尿酸ナトリウムの分解性、アルギニンからのアンモニア生成、pH 耐性、食塩耐性、乳酸の旋光性、ならびに各種糖類の発酵性を検討し、Bergey's Manual¹¹⁾などの記載を参考にして同定した。生育温度は、10℃と45℃での生育の有無を調べた。以上の方法で同定した *Enterococcus faecium* C210を以後の実験に供した。

抗菌活性単位(units)の算出法

抗菌活性は unit で表示した。まず、TYLG 培地(トリプトン1%, 酵母エキス0.5%, ラクトース0.5%, グルコース0.5%, ツイン 80 0.1%, L-システイン塩酸塩0.02%)で3回継代培養し賦活化した後、pH 4.5に調整して、4℃で15,000r.p.m., 20分間の遠心分離を行った菌体除去液を原液とする。その原液を限外濾過 (Amicon, M. W., 1,000 cut off) によって5倍に濃縮した後、pH 4.5の0.05M リン酸緩衝液により4倍、3倍、2倍濃縮液を作成する。そして、原液(0.1ml)における阻止円の直径を1 unit とし、各溶液の阻止円を測定して、抗菌活性単位(units)との関係を示す標準曲線を作成した。

抗菌性物質の最適生産条件の検討

Enterococcus faecium C210を1%量接種したTYLG 培地中で10℃, 15℃, 20℃, 30℃, 37℃および45℃にて培養した際の生育と抗菌活性を経時的に調べた。被検菌には *Staphylococcus aureus* IAM1011を用いた。

抗菌活性に及ぼす酵素処理、温度および pH の影響

試験液は全て pH 4.5に調整し、菌体を除去した培養液を限外濾過 (Amicon, M. W., 1,000 cut off) によって5倍に濃縮して実験に供した。酵素処理は Schillinger と Lücke の方法⁷⁾に準じて、Catalase (5 mg/ml), Carboxypeptidase (0.5mg/ml), Aminopeptidase (0.5mg/ml), Pronase E (0.5mg/ml), Proteinase K (0.5mg/ml), Pepsin (0.5mg/ml), Trypsin (0.5mg/ml) および Chymotrypsin (0.5mg/ml) (いずれも Sigma) をそれぞれ試験液に添加して、

37℃で12時間反応させた後、抗菌活性を測定した。そして、未処理の試験液の抗菌活性を100として残存活性(%)を表した。温度に対する影響は、4℃から121℃の範囲で所定時間保持した後に抗菌活性を調べ、未処理の試験液を対照として用い、これを100として残存活性を表した。pHに対する影響は、1 N塩酸あるいは水酸化ナトリウムにより、pH 4.5からpH 8.0の範囲に調整した。なお、pH 4.5の抗菌活性を100として残存活性を表した。

抗菌性物質の抗菌作用の検討

前項と同様に *Enterococcus faecium* C210の培養液について、遠心分離により菌体を除去し、限外濾過によって5倍に濃縮して試験液とした。試験液はpH 4.5とpH 6.5に調整して使用した。被検菌として用いた *Listeria monocytogenes* VTU206は、5 mlの液体培地に継代し(OD: 0.6~0.8)、3,000 r.p.m.で20分間遠心分離して上澄液を除去し、pH 4.5あるいはpH 6.5の0.05 M リン酸緩衝液1 mlを加えて菌液とした。そして、これを試験液に1%量接種して経時的に菌数を測定した。

結果と考察

バクテリオシン産生乳酸菌の同定

スクリーニングにより抗菌活性の認められた菌株の中で最も強い活性を示す菌株の同定を行った。本菌株は鶏肉より分離されたものであり、Table 1のようにグラム陽性の連鎖球菌で10℃および45℃で生育し、アルギニンからアンモニアを生成し、アラビノースを発酵することから *Enterococcus* 属であると思われた。また、各種糖類の発酵性試験から *Enterococcus faecium* と同定した。本報では、*Enterococcus faecium* C210と表記することにする。

抗菌スペクトルの検討

Enterococcus faecium C210が生産する抗菌性物質の抗菌スペクトルを乳酸菌11株、グラム陽性の食品汚染細菌3株、グラム陰性の食品汚染細菌2株について調べた。Table 2に示すように、*Lactobacillus amylovorus* JCM1126、*Lactobacillus rhamnosus* LA-2、*Streptococcus thermophilus* NIAI510、*Pediococcus pentosaceus* JCM5890、*Pediococcus acidilactici* JCM5885などの乳酸菌5株、*Staphylococcus aureus* IAM1011、*Listeria monocytogenes* VTU206などのグラム陽性の食品汚

Table 1 Taxonomic properties of the strain C210 isolated from chicken meat

Taxonomic properties	<i>Enterococcus faecium</i> C210	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC19434
Cell shape	Cocci	Cocci
Gram staining	+	+
Growth at 15℃	+	+
45℃	+	+
Lactic acid isomer	L	L
Gas from glucose	—	—
NH ₄ from arginine	+	+
Hippurate hydrolysis	—	+ or —
Acid from:		
Amygdalin	+	+
Arabinose	+	+ or —
Cellobiose	+	+
Esculin	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Gluconate	+	+ or —
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Mannitol	+	+
Mannose	+	+
Melezitose	—	—
Melibiose	—	+
Raffinose	—	—
Rhamnose	—	+ or —
Ribose	+	+
Salicin	+	+
Sorbitol	—	+ or —
Sucrose	+	+
Xylose	+	+ or —

+ : Positive, — : Negative

Table 2 Activity spectra of the antibacterial substance produced by *Enterococcus faecium* C210

Indicator bacteria used	Inhibitory zone (mm) ^{a)}	
	pH 4.5	pH 7.0
<i>Staphylococcus aureus</i> IAM 1011	17	15
<i>Listeria monocytogenes</i> VTU 206	17	15
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3025	—	—
<i>Pseudomonas fragi</i> IFO 3458	—	—
<i>Escherichia coli</i> RB	—	—
<i>Lactobacillus amylovorus</i> JCM 1126	15	—
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA-2	18	17
<i>Lactobacillus casei</i> NIAI L-14	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> IFO 3070	—	—
<i>Lactobacillus johnsonii</i> JCM 2012	—	—
<i>Lactococcus lactis</i> NIAI 527	—	—
<i>Enterococcus faecalis</i> RIMD 3116001	—	—
<i>Streptococcus thermophilus</i> NIAI 510	18	17
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> OR-2	—	—
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5890	16	—
<i>Pediococcus acidilactici</i> JCM 5885	22	21

a) Diameter of the disc was 13mm.

染細菌2株に対して抗菌活性が認められた。しかし、グラム陰性の食品汚染細菌に対しては認められなかった。

抗菌性物質の最適生産条件の検討

抗菌性物質の生産は Fig. 1 に示すように、10℃から37℃培養で、その活性が認められた。最も抗菌活性が強かった30℃培養では、菌接種後6時間から活性が見られ、24時間目まで24units/mlを維持した。また30℃と37℃培養では、60時間目に活性は消滅した。一方、45℃培養における菌の生育は良好であるにもかかわらず、活性は全く認められなかった。したがって、30℃で培養した時の24時間目までの培養液において、抗菌性物質の生産性が最も優れていた。

抗菌活性に及ぼす酵素処理、温度および pH の影響

抗菌活性に及ぼす酵素処理の影響を調べたところ、Pepsin, Carboxypeptidase, Aminopeptidase,

Pronase E および Proteinase K の処理によって、すべての活性が消滅した (Table 3)。一方, Catalase, Trypsin および Chymotrypsin による処理では活性は失われなかった。温度に対する影響では、100℃および121℃の加熱を行っても活性に変化は認められなかった (Table 4)。また、pH に対する影響を検討した結果、pH が高くなるにつれて、抗菌活性が低下する傾向が認められた (Table 5)。これらの結果から、この抗菌性物質は酸や過酸化水素ではなく蛋白質性物質であると考えられ、抗菌スペクトルなどの特徴からバクテリオシンであると考えられた。

抗菌性物質の抗菌作用

Listeria monocytogenes VTU 206において、pH 4.5では、バクテリオシンが菌数増減に影響することは無く、対照と同様に6.0CFU/mlを維持した (Fig 2)。一方、pH 6.5では、対照に顕著な差異は認めら

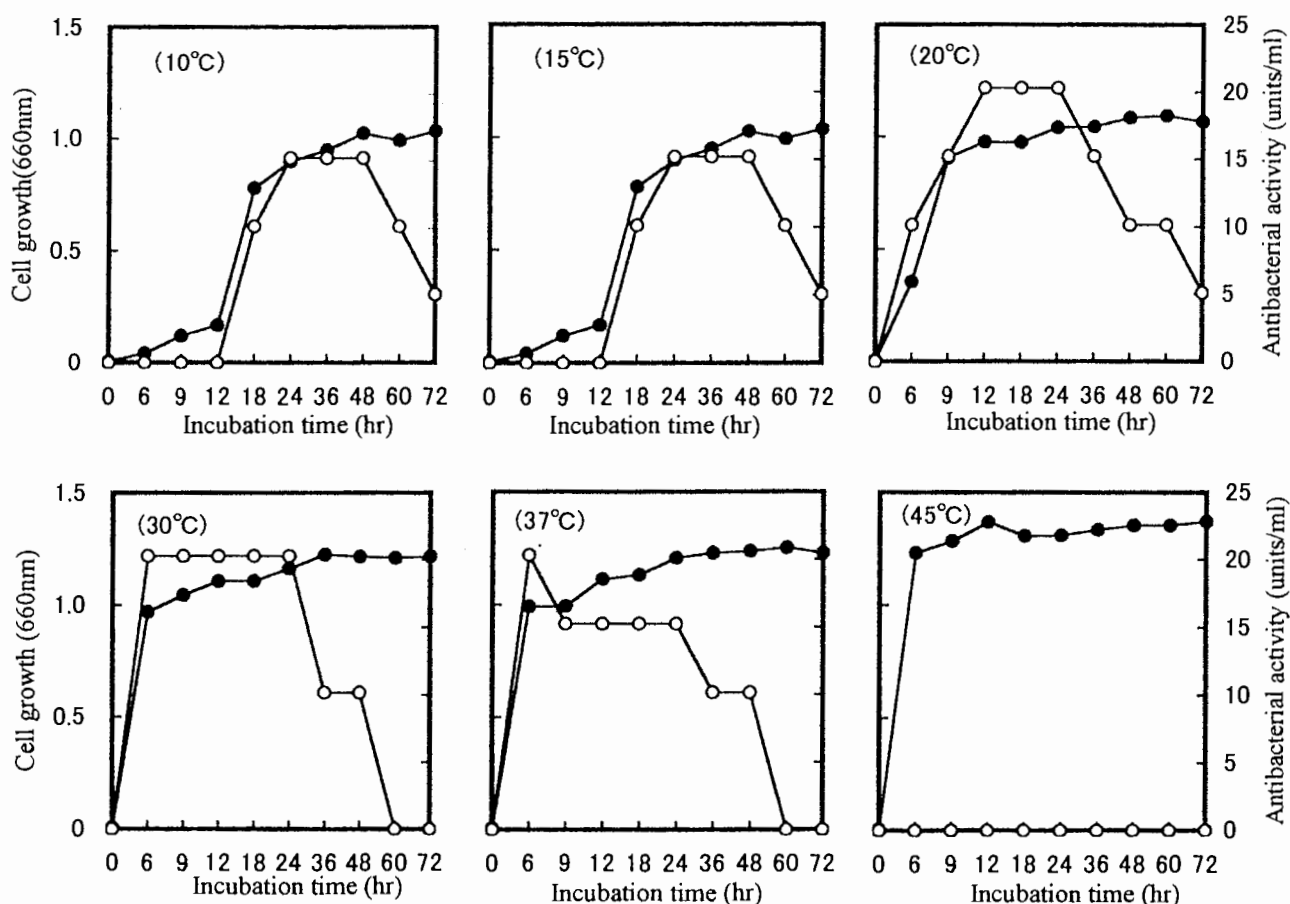


Fig. 1 Effects of incubation temperatures on cell growth and antibacterial activity in TYLG broth during cultivation with *Enterococcus faecium* C210.

Staphylococcus aureus IAM1011 was used as the indicator strain.

—●— Cell growth, —○— Antibacterial activity (units/ml)

Table 3 Effects of various enzymes on inhibitory activity of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* C210

Enzymes used	Residual antibacterial activity (%) ^{a)}
Catalase	100
Pepsin	0
Trypsin	79
Chymotrypsin	100
Carboxypeptidase	0
Aminopeptidase	0
Pronase E	0
Protenase K	0

a) *Staphylococcus aureus* IAM1011 was used as the indicator strain. Residual antibacterial activity was expressed as follows: (Inhibitory units after treatment)/(Inhibitory units before treatment) × 100

Table 4 Effects of storage and heat treatments on inhibitory activity of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* C210

Temperature & Time	Residual antibacterial activity (%) ^{a)}
4°C, 24h	100
10°C, 24h	100
20°C, 24h	100
30°C, 24h	100
37°C, 24h	100
45°C, 24h	100
63°C, 30min	100
100°C, 20min	100
121°C, 15min	100

a) *Staphylococcus aureus* IAM1011 was used as the indicator strain. Residual antibacterial activity was expressed as follows: (Inhibitory units after treatment)/(Inhibitory units before treatment) × 100

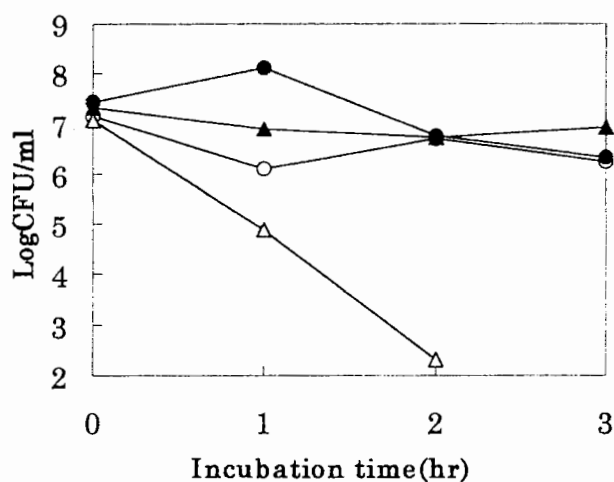
れなかったが、バクテリオシン含有液では、1時間後に4.9CFU/mlそして2時間後に2.3CFU/mlに減少し、3時間後には生菌は認められなくなった。データとして示していないが、このような傾向は *Staphylococcus aureus* IAM1011についても同様に認められた。Fig. 2の結果から、このバクテリオシンは、pH 6.5で殺菌作用を持つことが確認された。

Enterococcus faecium が生産するバクテリオシンには、多くの報告が見られる^{8,9,10,12)}。加藤らによって報告された Enterocin 100⁸⁾は100°Cでの加熱により抗菌活性が低下し、Arihara ら¹²⁾の報告したバクテリオシンも121°Cでの加熱処理により抗菌活性が低下

Table 5 Effects of various pH on inhibitory activity of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* C210

pH	Residual antibacterial activity (%) ^{a)}	
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
4.5	100	100
5.0	44	69
5.5	44	49
6.0	44	40
6.5	22	40
7.0	22	30
7.5	22	20
8.0	22	20

a) Residual antibacterial activity was expressed as follows: (Inhibitory units at pH 4.5 to pH 8.0)/(Inhibitory units at pH 4.5) × 100

**Fig. 2** Effects of bacteriocin on the growth of *Listeria monocytogenes* VTU206 in TYLG broth.

—○— with bacteriocin (pH 4.5)
 —●— without bacteriocin (pH 4.5)
 —△— with bacteriocin (pH 6.5)
 —▲— without bacteriocin (pH 6.5)

することから、本菌株の生産するバクテリオシンとは異なる性質を持つと思われる。また、バクテリオシンの最適生産条件の検討において、対数増殖期の後半から定常期の前半にかけて抗菌活性のピークが認められたが、その後の活性は低下する傾向であった。これらの結果は、Luis らの Enterocin P の活性の変化と酷似している¹⁰⁾。抗菌活性の低下と pH の関係については、Enan らが検討しており、バクテリオシンの被検菌に対する吸着性が pH によって変化するものと結論付けている¹³⁾。本菌株についても同様

の原因が考えられるため、今後検討していく必要がある。

要 約

発酵肉製品中の汚染細菌の増殖抑制を目的として、市販の食肉より乳酸菌732株を単離し、バクテリオシン産生能を有する乳酸菌の検索を行った。スクリーニングはペーパーディスク法で行い、被検菌には *Staphylococcus aureus* IAM1011と *Listeria monocytogenes* VTU206を用いた。スクリーニングによりバクテリオシン様物質産生能を示す菌株は4株で、最も強い抗菌活性を示す1株についての同定を行った結果、本菌株は *Enterococcus faecium* C210と同定した。抗菌活性は対数増殖期の後半から定常期の前半にかけて最大となり、それ以後は低下する傾向を示した。また、Catalaseによる処理では失活しなかったが、Pepsin, Carboxypeptidase, Aminopeptidase, Pronase E および Proteinase K 等の蛋白質分解酵素による処理で失活した。熱処理の影響を調べたところ、121℃で15分の条件においても抗菌活性は低下しなかった。pH に対しては、pH が高くなるにつれて抗菌活性が低下した。次に、抗菌スペクトルを検討した結果、乳酸菌5株の他に、*Staphylococcus aureus* IAM1011と *Listeria monocytogenes* VTU206等の食品汚染細菌に対して抗菌活性を示したが、グラム陰性菌に対しては示さなかった。また、食品汚染細菌に対する抗菌作用を調べたところ、pH 4.5では静菌作用を示し、pH 6.5では殺菌作用を示した。

文 献

- 1) Pederson, C.S. : Microbiology of Food Fermentations. pp. 210-234, AVI Publishing, Westport (1979)
- 2) 森岡 豊・野原英夫・荒木美穂・鈴木美紀・沼田正寛 : 有用微生物を用いたソフトサラミソーセージの発酵について. 日畜会報, **67**, 204-210 (1996)
- 3) Jessen, B. : Starter cultures for meat fermentations. In Fermented Meats (Campbell-Platt, G. and P. E. Cook, eds.), pp. 130-159, Blakie Academic & Professional, London (1995)
- 4) Davey, G.P. and B.C. Richardson : Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 84-89 (1981)
- 5) Hurst, A : Nisin. Adv. Appl. Microbiol., **27**, 85-123 (1981)
- 6) Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer : Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol., **167**, 439-446 (1986)
- 7) Schillinger, U. and F.K. Lücke : Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 1901-1906 (1989)
- 8) Kato, T., T. Matsuda, Y. Yoneyama, H. Kato and R. Nakamura : Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of its bacteriocin. Biosci. Biotech. Biochem., **57**, 551-556 (1993)
- 9) Aymerich, T., H. Holo, L.S. Havarstein, M. Hugas, M. Garriga and I.F. Nes : Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 1676-1682 (1996)
- 10) Cintas, L.M., P. Casaus, L.S. Havarstein, P.E. Hernandez and I.F. Nes : Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 4321-4330 (1997)
- 11) Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2). pp. 1043-1071, Williams & Wilkins, Baltimore (1986)
- 12) Arihara, K., R.G. Cassens and J.B. Luchansky : Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., **19**, 123-134 (1993)
- 13) Enan, G., A.A. El-Essawy, M. Uyttendaele and J. Debevere : Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG 1 isolated from dry sausage : Characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG 1. Int. J. Food Microbiol., **30**, 189-215 (1996)